

Essai de multiplication de cellules de *Geotrichum candidum* Link CBS 178-53 sur pâte de neutralisation

J. M. LABORBE (1), Y. RIEU (1), R. RATOMAHENINA (1), P. GALZY (1),
D. MONTET (2), M. PINA (2) et J. GRAILLE (2)

Résumé. — Les pâtes de neutralisation (PN) sont des sous-produits importants obtenus après raffinage alcalin d'huiles végétales brutes. Ces pâtes peuvent servir à la production de protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.), source de protéines alimentaires. Il a été montré la possibilité d'utiliser la souche de *Geotrichum candidum* pour cette production. L'influence du substrat sur le transfert d'oxygène a été étudiée aussi bien en culture continue qu'en culture discontinue. Des essais de production de *Geotrichum candidum* en culture continue ont été réalisés.

INTRODUCTION

Divers travaux antérieurs ont montré qu'il était possible d'obtenir des levures aliments par multiplication de *Geotrichum candidum* sur triglycérides [1] ou sur savons [2].

Nous donnons ici les résultats obtenus en utilisant un substrat d'origine industrielle : les pâtes de neutralisation obtenues au cours du raffinage de diverses huiles.

La souche utilisée, *Geotrichum candidum* Link CBS 178-53 a été choisie par suite du bon comportement de sa lipase à pH acide [1] et par suite de sa bonne croissance sur pâtes de neutralisation.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. — Substrat : les pâtes de neutralisation.

Les pâtes de neutralisation fournies par les Etablissements Lesieur Alimentaire ont la composition suivante :

- humidité : 77,5 p. 100 (P/P) obtenue par séchage à l'étuve à 105 °C ;
- matière organique totale : 19,8 p. 100 (P/P) par calcination ;
- matière grasse totale : 18,0 p. 100 (P/P) par extraction à l'hexane après acidification ;
- azote total : 0,05 p. 100 (P/P) par Kjeldahl ;
- phosphate total : 0,30 p. 100 (P/P) par colorimétrie ;

— phosphore sous forme phosphate : 0,22 p. 100 (P/P) par colorimétrie ;

— phosphore de la lécithine : 0,08 p. 100 (P/P) déduite des valeurs précédentes. La teneur en lécithine est obtenue en multipliant la teneur en phosphore de la lécithine par 30 ;

— teneur en lécithine : $0,08 \times 30 = 2,4$ p. 100 [Cooks et Van Rede, 1966] ;

— alcalinité des pâtes exprimées en NaOH : 2,1 p. 100 (P/P) par dosage potentiométrique ;

— teneur en chlorures (en NaCl) : 0,4 p. 100 (P/P) ;

— teneur en calcium : 0,1 p. 100 (P/P) par complexométrie ;

— teneur en magnésium : néant par complexométrie ;

— acidité de la matière grasse, exprimée en acide oléique : 6,2 p. 100 (P/P).

La teneur en cations des pâtes de neutralisation en mg/l est la suivante : Ca = 610 ; Cu = 2 ; Fe = 106 ; K = 376 ; Mg = 283 ; Mn = 14 ; Na = 16421 ; P = 3507 ; Zn = 28.

Les lipides présents, exprimés en pourcentage des lipides totaux sont :

Acides gras libres : 68,8 p. 100 ; Triglycérides : 14,9 p. 100 ; Diglycérides 1-4 : 11,6 ; Diglycérides 1-3 : 4,1 ; Monoglycérides : 0,6 p. 100.

La composition centésimale en acides gras des lipides totaux et des acides gras libres est donnée dans le tableau I où ne figurent que les principaux acides gras. On trouve aussi des acides gras en très faibles pourcentages (inférieur à 1 p. 100) comme C16 : 1, C20 : 1, C24 : 0.

TABLEAU I. — Composition en acides gras de la phase grasse totale et des acides gras libres

Acides gras (en pourcentage) des :	16 : 0	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3	18 : 2 conj.	20 : 0	24 : 0	Autres
Lipides totaux	9,8	3,5	41,2	32,0	1,7	8,3	1,1	1,1	1,3
Acides gras libres	11,1	4,2	46,0	27,7	2,2	5,6	0,8	0,8	1,6

(1) Chaire de Génétique et Microbiologie, ENSA-INRA, 34060 Montpellier Cedex (France).

(2) Division Chimie des Corps Gras, CIRAD-IRHO, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France)

2. — Milieux et techniques de culture.

a) Milieux de culture.

Nous avons utilisé le milieu de base suivant : MgSO_4 : 0,5 g.l⁻¹ ; KH_2PO_4 : 1 g.l⁻¹ ; $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$: 4 g.l⁻¹ ; Urée 4 g.l⁻¹ ; H_2SO_4 q.s.p. pH = 4.

Sauf information contraire, on stérilise d'une part le milieu de base additionné des pâtes de neutralisation par autoclavage à 120 °C pendant 35 min, et d'autre part l'urée par filtration (filtre Millipore 0,45 µm).

b) Techniques de cultures.

— Cultures en erlenmeyers.

Elles sont réalisées en erlenmeyers remplis au 1/10 de leur volume sous agitation (80 oscillations min⁻¹, amplitude 7 cm).

— Culture en fermenteur.

On a utilisé des fermenteurs Biolafitte de volumes 2 l et 20 l.

Lors de la culture en continu (Fig. 1) l'alimentation en substrat est réalisée par deux apports distincts :

- le milieu de base précédemment décrit ;
- une arrivée de pâtes de neutralisation diluées 2 fois.

La stérilisation est ainsi inutile : en effet le pH de la solution minérale est voisin de 1 et aucun micro-organisme ne se développe sur les pâtes de neutralisation diluées 2 fois.

3. — Détermination des coefficients volumétriques de transfert d'oxygène (Kl.a).

On a utilisé une méthode statistique selon Corrieu [3] mettant en œuvre une sonde à oxygène plongeant dans le fermenteur et reliée à un enregistreur numérique donnant la quantité d'oxygène dissous en p. 100.

4. — Méthodes analytiques.

Les méthodes d'analyses utilisées sont les suivantes :

- mesure de la densité optique d'une partie aliquote de la culture en vue de suivre la croissance de celle-ci ;
- extraction à l'hexane du substrat résiduel ;

— chromatographie sur couche mince pour déterminer les différentes catégories de lipides ;

— chromatographie en phase gazeuse pour la composition en acides gras.

Ces méthodes ainsi que la justification de leur emploi sont décrites plus longuement chez Montet [1] et Martinet [2].

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. — Influence des propriétés du substrat sur les transferts d'oxygène.

On a déterminé pour cela la valeur du Kl.a à différentes concentrations en substrat et à différentes valeurs d'agitation (Tabl. II, III).

On constate que les pâtes de neutralisation diminuent les transferts d'oxygène. Il semble cependant possible de travailler avec le fermenteur de 2 l jusqu'à environ 10 g.l⁻¹

TABLEAU II. — Valeurs de Kl.a (min⁻¹) du fermenteur de 2 litres. Débit d'air : V.V.M. = 2

Matière grasse g.l ⁻¹	Agitation tr/min ⁻¹	500	1 000	1 700
0		1,3	2,6	2,6
1,6		0,4	2,0	2,3
5,1		0,9	1,9	2,4
9,5		0,8	1,8	2,6
11,8		0,8	1,8	1,8

TABLEAU III. — Valeurs du Kl.a (min⁻¹) du fermenteur de 20 litres. Débit d'air : V.V.M. = 1

Matière grasse g.l ⁻¹	Agitation tr/min ⁻¹	400	600	800
0		2,5	4,0	4,1
1		1,7	2,1	2,8
2		1,7	2,3	3,0
6		1,3	1,7	1,7
11		1,7	1,8	1,7
18		1,4	1,7	1,8

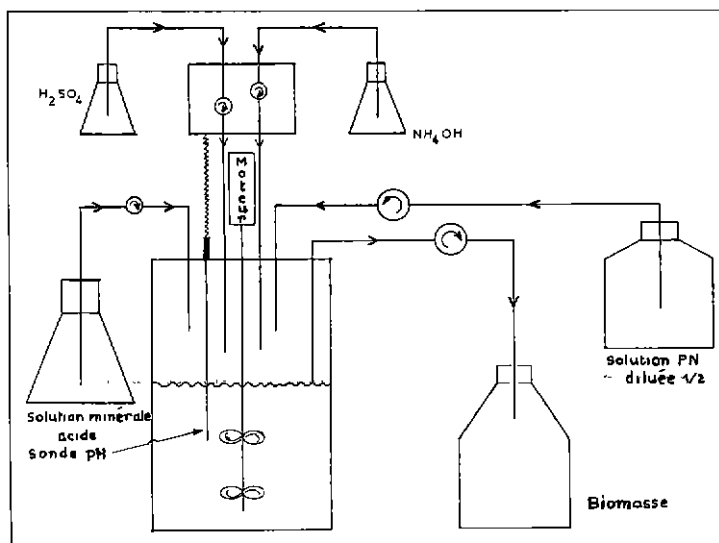


FIG. 1. — Alimentation en continu des fermenteurs.

de substrat en réglant l'agitation à $1\,700\text{ tr/min}^{-1}$ et le débit d'air à $V.V.M. = 2$. Dans le cas du fermenteur de 20 l, en l'absence de matières grasses, les transferts d'oxygène sont meilleurs pour des agitations plus faibles (800 tr/min^{-1}) et des débits d'aération plus faibles ($V.V.M. = 1$). Dans ce cas, l'effet de l'apport des matières grasses est cependant plus spectaculaire, probablement du fait de l'aération et de l'agitation plus modérées. Il faut remarquer toutefois que pour la fermentation continue, la teneur réelle en substrat demeure en principe faible dans le fermenteur ce qui permet finalement des transferts d'oxygène convenables. La tendance du substrat utilisé à donner des micelles pouvait faire craindre une baisse de la vitesse de croissance pour des concentrations très faibles en substrat. Vérification faite, le taux népérien de croissance ne varie pas pour des concentrations en substrat allant de 1 à 10 g.l^{-1} il est voisin de $0,15\text{ h}^{-1}$ comme pour des cultures en erlenmeyers.

2. — Etude de la multiplication en culture discontinue.

La culture en fermenteur de 2 l en discontinu ($V.V.M. = 2$; $1\,500\text{ tr/min}^{-1}$) permet de mettre en évidence une bonne croissance : le taux népérien est de $0,2\text{ h}^{-1}$ (Fig. 2A). Les glycérides et les savons sont utilisés pratiquement simultanément sans diauxie apparente (Fig. 2B). Par ailleurs il ne semble pas qu'il y ait une consommation préférentielle de tel ou tel acide gras (Fig. 2A).

Ramené aux lipides consommés le rendement est voisin de 1, mais sur 10 g de lipides totaux au départ, 8,6 g ont été consommés seulement.

Le fermenteur de 20 l a donné, avec un $V.V.M. = 1$ et une agitation de 600 tr/min^{-1} , le même taux népérien de croissance et le même rendement.

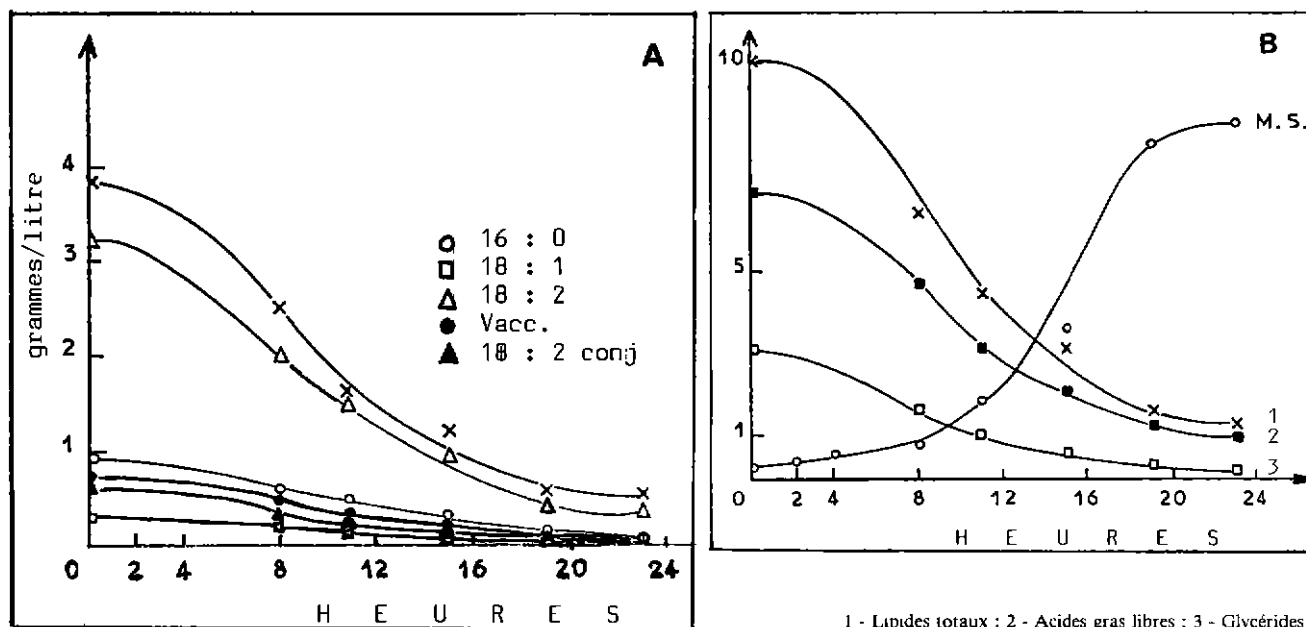


FIG. 2. — Culture discontinue :

A) cinétique d'utilisation des acides gras ; B) courbe de croissance et cinétique de consommation des différents types de lipides.

3. — Etude de la croissance en culture continue.

La fermentation peut être conduite en continu non stérilement, pourvu que diverses précautions soient prises : pH du fermenteur régulé entre 3,8 et 4 ; alimentation par des pâtes de neutralisation à $\text{pH} = 8$ ramenées à 90 g.l^{-1} de matière grasse ; alimentation séparée pour la solution de sels minéraux à pH voisin de 1.

Le fermenteur de 2 l a été utilisé avec un débit d'air de $V.V.M. = 2$, une agitation de $1\,500\text{ tr/min}^{-1}$, une alimentation, suivant la figure 1, permettant d'assurer une concentration de 8 g.l^{-1} de matières grasses.

La teneur en oxygène du milieu reste dans ces conditions voisine de 70 p. 100 de la saturation.

Le substrat résiduel à la sortie présente une concentration de 1 à 2 g.l^{-1} . Le rendement de transformation des lipides consommés est voisin de l'unité ce qui représente environ 6 g.l^{-1} de levures à la sortie du fermenteur. Le

temps de renouvellement est de 5 h 30 ce qui représente un taux de dilution de $0,18\text{ h}^{-1}$. La productivité du réacteur est d'environ $1,2\text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$. Le fermenteur de 20 l a été réglé comme suit :

— débit d'air $V.V.M. = 1$; agitation 600 tr/min^{-1} ; pH compris entre 3,8 et 4.

Ici encore on peut transformer 6 g.l^{-1} de lipides avec un rendement voisin de 1. La productivité reste donc très faible. Il n'est pas possible de dépasser à l'alimentation 8 g.l^{-1} de lipides totaux sans provoquer une baisse de rendement.

Notons que les milieux, après récupération des levures, contiennent environ 30 mg/l de protéines précipitables à l'acétone (40 ml d'acétone pour 60 ml de surnageant) ; ces protéines ont une activité lipasique spécifique de $6,1\text{ }\mu\text{moles d'acides gras libérés par min et par mg de protéine}$. Ces déterminations sont effectuées à $\text{pH} = 7$ et à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selon Yamada *et al.* [4].

CONCLUSION

L'utilisation des lipides pour la croissance de micro-organismes exige une forte aération par suite de la faible teneur en oxygène de ces molécules : de plus, les lipides ont une action inhibitrice sur les transferts d'oxygène. Il en résulte une productivité des fermenteurs plus faible que dans le cas des cultures sur glucides. De plus, le déchet industriel utilisé ici est anormalement riche en sodium probablement toxique pour la levure.

Dans les conditions où nous avons opéré, il a été possi-

ble d'obtenir un rendement en levure voisin de l'unité par rapport au substrat consommé avec un taux de dilution de l'ordre de 0,18 ; ces résultats restent acceptables. Par contre la productivité des 2 fermenteurs utilisés est restée, dans nos conditions d'utilisation, anormalement faible. Il pourrait être nécessaire d'effectuer des traitements sur la matière première et d'optimiser le milieu si l'on veut envisager la production de levure-aliment sur ce type de déchet industriel. Par exemple on pourrait travailler sur les huiles acides résultant du traitement des pâtes par l'acide sulfurique. Les huiles acides sont d'excellents substrats comme nous l'avons déjà montré [5].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MONTET D., RATOMAHENINA R., LABORBE J. M., PINA M., GRAILLE J., GALZY P. (1985). — Production de protéines d'organismes unicellulaires à partir de pâtes de neutralisation d'origine industrielle. *Oléagineux*, **40**, N° 10, p. 505-509.
- [2] MARTINET F., RATOMAHENINA R., GRAILLE J., GALZY P. (1982). — Production of food yeast from the solid fraction of palm oil. *Biotechnology Letters*, **4**, p. 9-12.
- [3] CORRIEU G. (1975). — Contribution à l'étude des problèmes de mesure et du transfert de l'oxygène en fermentation, réalisation d'une régulation automatique de la concentration en oxygène dissous. *Thèse de Doc. Ing. Dyon*, 135 p.
- [4] YAMADA K., OTA Y., MACHIDA H. (1982). — Studies on the production of lipase by microorganism. Part II : Quantitative determination of lipase. *Proceeding of « Meeting of Japan Agricultural Chemistry Society »*, p. 4-10.
- [5] BA A., RATOMAHENINA R., GRAILLE J., PINA M., GALZY P. (1983). — Consideration on fatty acids metabolism by yeasts. *Riv. ual. Sost. grasse*, **60**, p. 673-675.

SUMMARY

***Geotrichum candidum* Link CBS 178-53 cell multiplication trials on soapstocks.**

J. M. LABORBE, Y. RIEU, R. RATOMAHENINA, P. GALZY, D. MONTET, M. PINA, J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1987, **42**, N° 2, p. 83-86.

Soapstocks are important by-products obtained after the alkaline refining of raw vegetable oils. These soapstocks can be used in the production of single cell proteins (SCP) which are a source of food proteins. It has been shown that the strain *Geotrichum candidum* can be used for this production. The influence of the substrate on oxygen transfer has been studied, both in continuous and non-continuous culture. Tests were carried out to produce *Geotrichum candidum* in continuous culture.

RESUMEN

Ensayo de multiplicación de células de *Geotrichum candidum* Link CBS 178-53 sobre pasta de neutralización.

J. M. LABORBE, Y. RIEU, R. RATOMAHENINA, P. GALZY, D. MONTET, M. PINA, J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1987, **42**, N° 2, p. 83-86.

Las pastas de neutralización (PN) son importantes subproductos obtenidos previa refinación alcalina de aceites vegetales crudos. Tales pastas pueden emplearse en la producción de proteínas de organismos unicelulares (P.O.U.) que constituyen fuentes de proteínas comestibles. Se demostró la posibilidad de utilizar cepas de *Geotrichum candidum* para esta producción. Se estudió la influencia del sustrato en la transferencia de oxígeno, tanto en los cultivos continuos como discontinuos. Se realizaron ensayos de producción de *Geotrichum candidum* en cultivo continuo.